

Über den Einfluß
verschiedener Antibiotika auf das Wachstum
von Gewebekulturen aus Linsenepithel

von
Gabriele Lang, geb. Gamringer
aus
Bärnzell



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Augenklinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. E. Schreck

Über den Einfluß
verschiedener Antibiotika auf das Wachstum
von Gewebekulturen aus Linsenepithel

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Gabriele Lang, geb. Gamringer

aus

Bärnzell

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof.Dr. W. Kersten

Referent: Prof.Dr. U. Mayer

Korreferent: Prof.Dr. E. Schreck

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.1981

Inhaltsverzeichnis	S
A. EINLEITUNG: Antibiotikaaanwendung in der Ophthalmologie, Überblick über Publikationen	1
B. MATERIAL UND METHODE:	
1. Präparation des Untersuchungsgutes	7
2. Vorbereitung der Gefäße	8
3. Verwendetes Medium und Zusatz verschiedener Pharmaca	8
4. Biomikroskopie und Auswertungsmethode	11
C. ERGEBNISSE	
1. Kontrollgruppen	13
a. Biomikroskopische Befunde	
b. Biomikroskopische Aufnahmen von Linsen- epithelkulturen in TCM-199 mit 20 % Kälber- serum	16
c. Serienergebnisse der Kontrollgruppen aus allen Versuchsansätzen	18
2. Kulturen unter Gentamicinzusatz	
a. Biomikroskopische Befunde	20
b. Biomikroskopische Aufnahmen von Linsen- epithelkulturen in TCM-199 mit 20 % Kälber- serum unter Zusatz von Gentamicin	22
c. Serienergebnisse aus allen Versuchs- ansätzen mit Gentamicin	23
3. Kulturen unter Zusatz von Penicillin G	26
a. Biomikroskopische Befunde	26

	S
b. Biomikroskopische Aufnahme einer Lin - senepithelkultur in TCM-199 mit 20% Käl- berserum unter Zusatz von Penicillin G	27
c. Serienergebnisse aus allen Versuchsans- ätzen mit Penicillin G	28
4. Kulturen unter Zusatz von Rolitetetracyclin	31
a. Biomikroskopische Beobachtungen	31
b. Biomikroskopische Aufnahmen von Linsen- epithelkulturen unter Zusatz von Rolitetra- cyclin zu TCM-199 mit 20 % Kälberserum	33
c. Serienergebnisse aus allen Versuchsansätzen mit Rolitetetracyclin	37
D. DISKUSSION	40
E. ZUSAMMENFASSUNG	47
F. LITERATURVERZEICHNIS	48

A. EINLEITUNG

Die Prognose der bakteriellen Infektion auf dem Gebiet der Ophthalmologie gilt heute noch aus mehreren Gründen als unsicher, da diese an fast allen Teilen des Auges zu ernststen Komplikationen führen kann und das Augenlicht gefährdet. Denn einmal verursacht die Infektion eine exsudative Trübung der klaren, brechenden Medien des Auges; zum anderen können sich optisch störende Narben ausbilden. Des weiteren besteht das Risiko bleibender Verwachsungen, welche den Flüssigkeitsstrom des Kammerwassers behindern und somit zum Sekundärglaukom führen können. Außerdem muß man an die Auswirkung bakterieller Toxine auf die Linse und Netzhaut denken, die zusammen mit infektionsbedingten Ernährungsstörungen eine Cataracta complicata und Netzhautschäden verursachen können. Überdies besteht die Gefahr einer eitrigen Panophthalmie, die, unter Erblindung mit starken Schmerzen, eine Evisceratio bulbi erforderlich machen kann.

Seit der Anwendung von Antibiotica bei der Therapie von Augeninfektionen ist die Prognose im allgemeinen günstiger, doch gibt es immer wieder Fälle, deren Behandlung bei der Auswahl und Dosierung von Antibiotika genaue Kenntnisse und eine enge Zusammenarbeit mit den Bakteriologen voraussetzt, um schwere,

irreversible Schäden am Auge verhindern zu können. Aus diesem Grund ist es wichtig, zunächst Antibiotika mit möglichst breitem und bekanntem Wirkungsspektrum zu wählen, bis die bakteriologische Resistenzprüfung ein gezieltes Vorgehen ermöglicht.

Unter diesem Gesichtspunkt haben wir die Antibiotika Gentamicin, Penicillin G und Rolitetetracyclin für unsere Untersuchungen gewählt, da sie sich gemeinsam durch ihre gute Wirksamkeit auf zahlreiche grampositive und gramnegative Erreger auszeichnen. Gentamicin ist des weiteren besonders wirksam gegen die Hospitalismuskeime *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* und Staphylokokken (Anwärter, Furguele, Halasa, Hanselmayer, Naumann). Penicillin G kann auch bei anaeroben Sporenbildnern eingesetzt werden. Rolitetetracyclin ist allerdings nicht wirksam bei Erregern der *Pseudomonas*- und *Proteus*gruppe (Firmenangaben).

Gleichzeitig ist aber bei der Auswahl der Antibiotika eine gute lokale Verträglichkeit wichtig. Dies ist besonders in solchen Situationen von Interesse, wo die hochdifferenzierten Gewebe des Auges mit Antibiotikallösungen höherer Konzentration direkt in Berührung kommen. Denn einmal werden diese subkonjunk-

tival injiziert und zum anderen in kritischen Fällen zur Vorderkammerspülung verwendet, wenn die übliche lokale Behandlung mit Antibiotika in Form von Tropfen oder Salben kombiniert mit systemischer Therapie als nicht ausreichend erscheint.

Des weiteren werden die Gewebe des Auges, die zur Transplantation vorgesehen sind, mit Hilfe von Antibiotika vorbereitet und konserviert. So ist es üblich die Spenderbulbi mit Antibiotikallösungen zu spülen, ehe das zur Transplantation vorgesehene Gewebe entnommen wird. Zum anderen werden den Medien, in denen das Spendermaterial bis zu einem gewissen Zeitraum aufbewahrt werden kann, Antibiotika in definierter Konzentration zugesetzt.

Ungeachtet der pharmakologischen Erfahrung, die besagt: "Dosis sola facit venenum", interessiert uns daher die Frage, wie die einzelnen Antibiotika auf die Zellen des Auges wirken und in welcher Dosierung sie über längere Zeit angewendet werden können ohne bleibende Schäden am Auge zu hinterlassen.

Angeichts dieser Fragestellung erschien uns das hochempfindliche Epithel der Augenlinse für die Untersuchungen als geeignet. Histologisch stellt es

sich als einzellige Schicht kubischer Zellen dar, welche der vorderen Linsenkapsel anliegen (Rohen). Die Zellen sehen im dreidimensionalen Elektronenmikroskop wie nebeneinander liegende "Pflastersteine" aus und haben einen Durchmesser von $10\text{ }\mu$ (Obermann). Brini hat 1952 die normale Struktur des Linsenepithels genauer untersucht. Er beschreibt drei Typen von Zellen und zwar poly- bis hexagonale, regelmäßig geordnete Zellen mit rundem oder ovalem Kern, daneben sternförmig verzweigte Zellen mit intensiv anfärbbarem Cytoplasma und schwach anfärbbarem Kern und schließlich helle, große Zellen in Äquatornähe. Rohen (1964) ist der Ansicht, daß es innerhalb der Linsenepithelzellen keine echte Typengliederung gibt, dagegen aber in topochemischer Hinsicht zonale Unterschiede bestehen.

Die Kultivierung von Linsenepithelzellen in vitro gelang erstmals Kirby 1926. Eine genaue Beschreibung über das Aussehen und Verhalten der Epithelzellen in vitro gibt van den Heuvel in seiner umfassenden Studie aus dem Jahr 1956. Danach sind die Zellgrenzen teilweise schwer auszumachen oder erscheinen als sehr dünne, dunkle Linien. Die Zellen

besitzen keine feste Form. Im Cytoplasma finden sich zahlreiche Granula und der Kern enthält feine Chromatinstrukturen. Nach Bakker neigt das Linsenepithel in der Gewebekultur zur Membranbildung, zeigt eine Tendenz, den epithelialen Verband aufrecht zu erhalten und regeneriert kleine Defekte durch flächenhafte Ausbreitung und Mitosen vollständig. Dabei nehmen die Zellen spindelförmige bis bizarre Form an und bilden Protoplasmafortsätze unterschiedlicher Länge aus, deren Aussehen van den Heuvel mit Fibroblasten vergleicht. Damit konform gehen die Beobachtungen von Mamo und Leinfelder (1958) und Mayer (1974). Diese stellten erste Anzeichen der fibroblastenähnlichen Zellaussprossung nach 48 Stunden Inkubation fest. Nach Mayer besitzen die Linsenepithelzellen eine Generationszeit von 15 Stunden und haben einen Sauerstoffverbrauch von 0,4 bis 0,6 μ l/mg/h. Das Linsenepithel ist reich an DNA und RNA (von Sallmann, van den Heuvel), die bekanntlich für die Proteinsynthese verantwortlich sind. Den genauen Ablauf der Mitose der Epithelzellen verfolgten Riley und Devi 1967.

Wie alle Zellen reagiert auch das Linsenepithel auf die Einwirkung von Noxen mit degenerativen Veränderungen. Kirby hat schon 1929 davon berichtet, daß die Epithelzellen als Folge von toxischen Ein-

flüssen ihre Durchsichtigkeit einbüßen, vakuolige und kugelige Zelleinschlüsse aufweisen, untereinander den Kontakt verlieren oder ganz absterben. Bakker beschrieb 1936 in diesem Zusammenhang das Auftreten von Bläschenzellen und Kernschwund infolge von Karyolyse. Mann beobachtete 1948, daß geschädigte Linsenepithelzellen vermehrt randständige Kerne aufwiesen. Van den Heuvel beschrieb als morphologisches Substrat der Epithelschädigung Zell- und Kernschwellung oder Zellschrumpfung, Kernpyknose, Vakuolen und Fettablagerungen im Protoplasma. Er deutete diese Veränderungen als langsames Absterben der Zellen, wobei seiner Meinung nach die Fettablagerungen als frühes Symptom degenerativer Veränderungen anzusehen sind. Daran schließen die Beobachtungen von Mamo und Leinfelder und Mayer an.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Literatur prüft die folgende Studie den Einfluß der Antibiotika Gentamicin, Penicillin G und Rolitetra-cyclin auf das Wachstum von Gewebekulturen aus Linsenepithel in Abhängigkeit von ihrer Konzentration.

B. MATERIAL UND METHODE

1. Präparation des Untersuchungsgutes

Die Untersuchungen erfolgten an Geweben des Auges von frisch geschlachteten Kälbern. Die Bulbi wurden sofort nach dem Schlachten enukleiert und anschließend im Kühlbehälter bei null bis plus sechs Grad C ins Labor gebracht. Ihre Präparation erfolgte innerhalb der nächsten zwei bis drei Stunden unter sterilen Kautelen. Die dabei auftretenden Zellveränderungen in Form von Trübungen und Vakuolen sind wie von Mayer 1974 nachgewiesen größtenteils reversibel. Der zu präparierende Bulbus wurde nach gründlicher Spülung mit Aqua dest. in eine mit sterilem Zellstoff ausgelegte Petrischale gebracht. Eine auf die Cornea aufgetropfte Penicillin-Streptomycin-Lösung ließ sich nach kurzer Einwirkdauer erneut mit Aqua dest. abspülen. Sodann wurde die Vorderkammer mit einer Rasierklinge am Limbus eröffnet und die Cornea mit Schere und Pinzette in toto abpräpariert. Die Iris ließ sich mit einer sterilen Fasspinzette herausreißen. Danach wurde die Linsenkapsel unter sterilen Kautelen mit einer Schere entlang dem Äquator aufgeschnitten. Anschließend konnte man das Kapselhaut-

chen, an dem das Linsenepithel anhaftet, abziehen und in vorbereitete Gefäße bringen (U. Mayer).

2. Vorbereitung der Gefäße

Für die biomikroskopische Beobachtung der Zellkulturen eigneten sich die Leighton-Röhrchen besonders gut, da sie einen abgeflachten Boden besitzen. Wenn die Kapselhäutchen auf ein Deckglas aufgebracht wurden, verwendeten wir Reagenzgläser. Nach gründlicher Reinigung und ausreichender Wässerung erfolgte ein dreimaliges Spülen und Auskochen der Gefäße mit Aqua dest., da eventuelle Reste von Schmutz und Reinigungsmitteln die hochempfindlichen Gewebekulturen erheblich stören würden. Die Gläser wurden in einem Spezialschrank getrocknet, in Metallfolie verpackt und wie die Instrumente bei 180° C vier Stunden lang sterilisiert. Dann konnte man in die Gefäße mit einer Pipette fünf Millimeter des jeweiligen Mediums einbringen und sie mit sterilen Gummistopfen verschließen.

3. Verwendetes Medium und Zusatz verschiedener

Pharmaca

Jeder Versuchsansatz bestand aus zwei Gruppen. Zum einen verwendeten wir TCM 199 (tissue culture

medium, DIFCO LABORATORIES USA) mit 20 % Kälberserum, ein bewährtes Inkubationsmedium welches von Merriam und Kinsey 1950 empfohlen wurde.

Die darin inkubierten Linsenepithelzellen dienten als Kontrollgruppe eines jeden Ansatzes. Bei der zu prüfenden Vergleichsgruppe erfolgte der Zusatz jeweils eines Antibiotikums in bestimmter Konzentration zu dem gleichen Medium unter sterilen Bedingungen. Die gewählte Ausgangskonzentration entsprach etwa der Serumkonzentration bezogen auf die therapeutisch maximal vertretbare Dosis bei angenommen fünf Liter Blut (Firmenangaben).

Die erste Versuchsreihe begann mit Gentamicin in einer Konzentration von 8 mg/100 ml Medium. Als Testsubstanz fand Sulmycin von der Firma BYK-ESSEX in handelsüblicher Ampulle als Gentamicinsulfat (1 ml = 40 mg Gentamicin) Verwendung. Die Ausgangskonzentration bei Penicillin G betrug 800 000 I.E./100 ml Medium. Zur Anwendung kam Penicillin G Horm in standardisierter Form (eine Flasche zu 1000 000 I.E. Penicillin-G-Natrium). Bei Rolitetetracyclin lag die Ausgangskonzentration bei 16,5 mg/100 ml Medium. Als Testsubstanz diente Reverin von der Firma HOECHST in handelsüblicher Form (eine Flasche zu je 275 mg Rolitetetracyclin).

Die Konzentration des Testmediums wurde jeweils solange um die Hälfte des Ausgangswertes verändert, bis zum einen eine vollständige Wachstumshemmung zu beobachten war, und zum anderen die Kultur ein der Kontrollgruppe adäquates fibroblastenähnliches Wachstum der Linsenepithelzellen zeigte. Von jeder Antibiotikumkanzenkration wurden Kulturen in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen angelegt, um das jeweilige Ergebnis auf seine Reproduzierbarkeit zu prüfen. Den Verbrauch des Mediums durch die Linsenepithelien zeigte der Farbumschlag des Indikators von Rot nach Gelb an, worauf sich das Medium unter sterilen Kautelen wechseln ließ. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei einer Temperatur von 36,5 bis 37° C und lag damit nach Voaden im oberen Optimalbereich. Der pH-Wert des Mediums betrug 6,8 bis 7,2. In diesem Intervall zeigten die Linsenepithelien gute Proliferationstendenz und es entsprach etwa dem pH-Wirkungsoptimum der untersuchten Antibiotika, das Heilmeyer, Otten und Plempel für Gentamicin mit 7,0 bis 7,8 für Penicillin G mit 5,0 bis 7,0 und für Rolitetraeyclin mit 6,1 bis 6,8 angegeben.

4. Biomikroskopie und Auswertungsmethode

Zur biomikroskopischen Beobachtung der Epithelkulturen diente das umgekehrte Mikroskop von LEITZ. Die photographischen Aufnahmen erfolgten mit Hilfe einer vollautomatischen Mikroskopkamera (LEITZ-ORTHOMAT).

Nach den Ergebnissen von Mamo und Leinfelder und Mayer erschien eine Zellbeobachtung im Abstand von zwei Tagen als ausreichend. Die Dauer der Beobachtung betrug maximal 20 Tage. Die Beurteilung der Linsenepithelzellen erfolgte jeweils aus dem direkten Vergleich der Testgruppe mit der Kontrollgruppe aus dem selben Ansatz, ein Vorgehen das auch die Auswertung von kleinen Serien ermöglichte. Als morphologische Kriterien dienten: Fibroblastenähnliche Proliferation der Zellen, Überleben ohne Alteration, degenerative Veränderungen wie Zellquellung oder -schrumpfung, Kernschwellung oder -pyknose, Karyolyse, Vakuolenbildung, intrazelluläre Ablagerungen, Auflösung des Zellverbandes und Zelltod. Die statistische Auswertung erfolgte aus der Gegenüberstellung der Anzahl der Kulturen mit zu denen ohne fibroblastenähnliches Zellwachstum. Daraus ergaben sich durch die Zusammenfassung aller Kulturen aus den drei

großen Serien I bis III die Summenzahlen für die Kontrollgruppen und durch die Zusammenfassung aller Kulturen aus den Ansätzen mit gleicher Antibiotikumkonzentration die Summenzahlen für die Versuchsreihen I (Zusatz von Gentamicin), II (Zusatz von Penicillin G) und III (Zusatz von Rolitetetracyclin). Aus den Summenzahlen ließ sich der Anteil der gewachsenen Kulturen in % ermitteln. Bei Bezugswerten unter 20 wurden die Prozentangaben wegen des geringen Aussagewertes in Klammern gesetzt. Die Anzahl der beobachteten Epithelkulturen reduzierte sich bei den Kontrollgruppen dadurch, daß trotz sorgfältiger steriler Kautelen durch Präparation und Mediumwechsel während der Inkubation immer wieder Kulturen unsteril wurden. Die tabellarische Aufzählung der Serienergebnisse schien bis zum 10. Inkubationstag ausreichend. Die graphischen Darstellungen zeigen die Anteile der fibroblastenähnlich gewachsenen Kulturen in % in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bis zum 15. Tag.

Zur statistischen Beurteilung der Effekte der unterschiedlichen Antibiotikakonzentration wurde das Verlaufsergebnis jeder Kultur durch den Anteil der Tage mit Wachstum an der Gesamtzahl der Beobachtungstage (in der Regel sechs) charakterisiert. Diese Wahl des Beurteilungskriteriums erscheint zweckmäßig, da sich nach den Graphiken 1 bis 3 die Vergleichsgruppen vornehmlich im Niveau des Anteils gewachsener Kulturen unterscheiden.

Die Dosierungseffekte wurden dann pro Antibiotikum mittels einer einfachen Varianzanalyse geprüft.^x Als gut verträglich galt eine Antibiotikumkonzentration dann, wenn eine Übereinstimmung der Testgruppe mit der entsprechenden Kontrollgruppe sowohl in morphologischer als auch in quantitativer Hinsicht erzielt wurde.

Durch das Aufbringen des Kapselhäutchens mit dem anhaftenden Epithel auf ein Deckglas konnte man den gezüchteten Epithelrasen auf seiner Unterlage dem Inkubationsgefäß entnehmen. Zur genaueren Darstellung der normalen morphologischen Struktur proliferierender Linsenepithelien eignete sich die Fixation des Präparates nach BOUIN und die anschließende Färbung mit Hämalaun-Eosin nach standardisierter Methode. Der Nachweis von intrazellulären Lipidablagerungen ließ sich mit der Oil-Red-O-Spezialfärbung ohne vorherige Fixation erbringen, ein Verfahren bei dem die Lipide vollständig erhalten blieben.

^x

Herrn Dr. W. Gunselmann, Institut für Med. Statistik und Dokumentation der Universität Erlangen (Vorstand: Prof.Dr.L.Horbach), sei für seine diesbezügliche Beratung gedankt.

C. ERGEBNISSE

1. Kontrollgruppen.

a. Biomikroskopische Befunde

Bei allen Kulturen zeigten sich regelmäßig viele überlebende Zellen im erhaltenen Zellverband mit runden bis ovalen Kernen und nur wenige abgestorbene Epithelien. Die Zellen erinnerten in ihrem Aussehen an "Froschlaich", wobei die Zellgrenzen im durchfallenden Licht nicht immer deutlich zu erkennen waren. In Übereinstimmung mit Mamo und Leinfelder und Mayer traten erste Anzeichen der fibroblastenähnlichen Zellaussprossung nach frühestens 48 Stunden auf (siehe Abb.1). Besonders in den Bereichen, wo trotz möglichst schonendem Vorgehen bei der Präparation Zellücken auf dem Kapselhäutchen entstanden waren, änderten die Zellen ihre Form. Sie vergrößerten sich um ein Vielfaches, nahmen polymorphe Gestalt an und bildeten Protoplasmafortsätze unterschiedlicher Länge aus, mit denen sie in Form von Interzellularbrücken Kontakt zu Nachbarzellen aufnahmen. Die Epithelien bildeten auch syncytiale Verbände mit verwaschenen Zellgrenzen und auffallend großen Zellen und Kernen. Wiederholt ließen sich mehrkernige Zellen beobachten. Kleinere Defekte auf dem Kapselhäutchen reepithelisierten sich auf diese Weise - wie schon von Bakker beschrieben - innerhalb weniger Tage nahezu

vollständig. In einigen Fällen wuchs das Linsenepithel über das Kapselhäutchen hinaus und auf dem Glashoden weiter. Auch vom Kapselhäutchen abgelöste, frei im Medium schwimmende Zellen überlebten und zeigten fibroblastenähnliche Aussprossung. Mit zunehmender Inkubationsdauer traten vakuolige und gelb-braune Zelleinschlüsse auf (siehe Abb. 2).

Die Übersichtsvergrößerung der Kultur, die auf einem Deckglas gezüchtet, nach Bouin fixiert und mit Hämalaun-Eosin gefärbt wurde, zeigte entsprechend dem biomikroskopischen Bild einen dichten Rasen proliferierender Zellen unterschiedlicher Größe und Form. Die höheren Stufen der Vergrößerung ließen die polymorphe Gestalt der teilweise mehrkernigen Zellen erkennen. Zahlreiche Protoplasmafortsätze unterschiedlicher Länge, Interzellulärbrücken und syncytiale Verbindungen gelangten zur Darstellung (siehe Abb. 3 und 4). Die vergrößerten, mittel- bis randständigen Kerne besaßen deutliche Chromatinstrukturen.

b. Biomikroskopische Aufnahmen von Linsenepithelkulturen in TCM 199 mit 20% Kälberserum

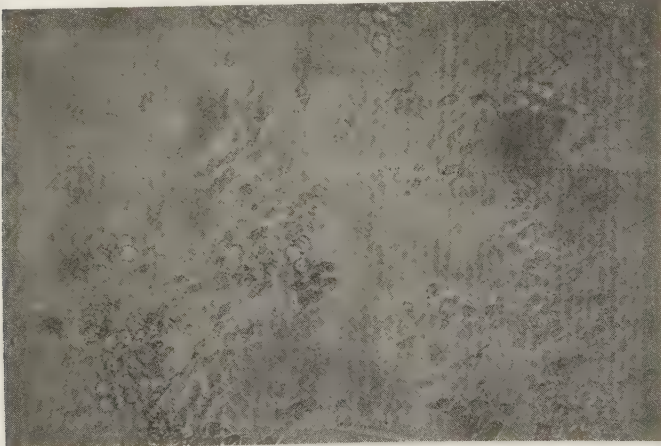


Abb.1: Beginnende fibroblastenähnliche Aussprossung von Epithelzellen nach zwei Tagen Inkubation (1:80)



Abb.2: Proliferierende Zellen nach sieben Tagen Inkubation, vakuolige und dunkle Zelleinschlüsse (1:80)

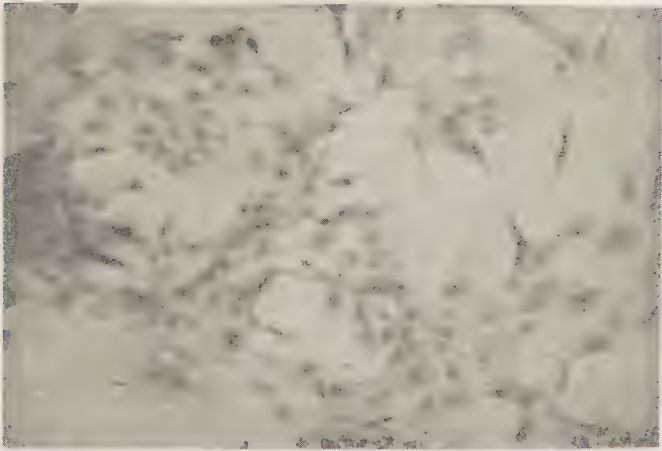


Abb.3: Proliferierende Linsenepithelzellen nach 13 Tagen Inkubation, Züchtung auf einem Objektträger, Fixation nach Bouin, Färbung mit Hämalaun-Eosin, vergrößerte Zellen und Kerne, zahlreiche Protoplasmafortsätze (1:100)



Abb. 4: Gleiches Präparat (1:250)

Tab. 1: Fibroblastenähnliches Wachstum:

Einzelsergebnisse der Kontrollgruppen aus den drei großen Versuchsreihen I bis III

Serie	Zeitpunkt Wachstum	3. Tag		5. Tag		8. Tag		10. Tag		
		nein	ja	gesamt	nein	ja	gesamt	nein	ja	gesamt
I	Ansatz 1	3	9	12	3	7	10	4	4	8
	2	12	10	22	8	6	14	6	5	11
	3	6	8	14	4	6	10	4	6	10
	4	3	3	6	3	3	6	3	3	6
	Gesamt als %	24	30	54	18	22	40	17	18	35
		45	55	100	45	55	100	48	52	100
II	Ansatz 1	6	7	13	2	11	13	3	8	12
	2	2	11	13	2	8	10	3	8	9
	3	10	17	27	8	13	21	4	14	18
	4	4	3	7	4	3	7	4	3	7
	Gesamt als %	22	38	60	16	35	51	14	32	46
		37	63	100	31	69	100	31	69	100
III	Ansatz 1	8	8	16	9	6	15	8	8	16
	2	8	10	18	8	9	17	7	9	16
	3	10	10	20	9	8	17	5	10	15
	4	17	14	31	14	13	27	12	11	23
	5	9	7	16	9	6	15	10	5	15
		52	49	101	49	42	91	42	41	83
	Gesamt als %	52	48	100	54	46	100	51	49	100

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß bei jedem Versuchsansatz ein Teil der in TCM-199 mit 20% Kälberserum inkubierten Kulturen fibroblastenähnliche Zellproliferation aufwies. Trotz annähernd identischer Versuchsbedingungen zeigten jedoch nicht alle Epithelien dieselbe Wachstumstendenz. Ungeachtet eines möglichst gewebeschonenden Vorgehens scheinen nicht alle Linsenepithelien den Tod des Spenders und ihre Aussaat gleich gut zu überleben. Aus diesem Grund war es nötig, jedem Versuchsansatz eine neue Kontrollgruppe beizufügen und nur aus dem direkten Vergleich eine Aussage über die Antibiotikumswirkung zu treffen. Die Zusammenfassung aller Ergebnisse erbrachte, daß von 215 Kulturen am dritten Inkubationstag 117 gewachsen waren, das entspricht etwa 54%. Aus ihrer Zusammenfassung errechneten wir für den fünften und achten Inkubationstag eine Wachstumsrate von 54 und 55 %. Im Lauf der weiteren Beobachtung ließ sich eine Abnahme der Proliferationsneigung erkennen.

2. Kulturen unter Gentamicinzusatz

a. Biomikroskopische Befunde

Die Übersichtsvergrößerung bei der Ausgangskonzentration von 8 mg Gentamicin/100 ml Medium zeigte nach zwei Tagen Inkubation neben überlebenden Zellen viele degenerierte Epithelien. Diese erschienen im durchfallenden Licht weniger durchsichtig und dunkler als normal und befanden sich nicht mehr im üblichen Zellverband. Die höheren Vergrößerungen ließen erkennen, daß die Zellen zum Teil den Kontakt untereinander verloren hatten und im Vergleich zur Kontrolle geschrumpft waren, die Kerne erschienen pyknotisch. Ein Teil der Zellen war bereits abgestorben (siehe Abb.5). Bei keiner Kultur konnte man fibroblastenähnliche Aus sprossung feststellen. Im Lauf der weiteren Beobachtung schritten die degenerativen Veränderungen fort und viele Zellen starben ab. Das Epithelwachstum blieb vollständig gehemmt. Nach Verdünnung der Konzentration auf 4 mg Gentamicin/100 ml fanden sich nach zwei Tagen Inkubation neben überlebenden Zellen im erhaltenen Epithelverband immer noch vermehrt alterierte Zellen mit oben beschriebenem Schädigungsmuster. Die fibroblastenähnliche Proliferation zeigte sich weiter-

hin gehemmt. Während der folgenden Tage nahm die Epitheldegeneration und die Anzahl der zugrundegegangenen Zellen zu. Nach Reduzierung der Gentamicinkonzentration auf 2 und 1 mg/100 ml ließ sich morphologisch kein Unterschied zur Kontrollgruppe aus dem gleichen Ansatz erkennen. Nach zwei Tagen Inkubation zeigten sich viele überlebende Zellen und deutliche Anzeichen beginnender Epithelaussprossung bei einem Teil der Kulturen. Das Wachstum hielt im Verlauf der weiteren Beobachtung an (siehe Abb. 6).

b. Biomikroskopische Aufnahmen von Linsenepithelkulturen in TCM-199 mit 20% Kälberserum unter Zusatz von Gentamicin



Abb. 5: Hemmung der fibroblastenähnlichen Proliferation und Epitheldestruktion unter Zusatz von 8 mg Gentamin/100 ml nach 2 Tagen Inkubation (1:80)



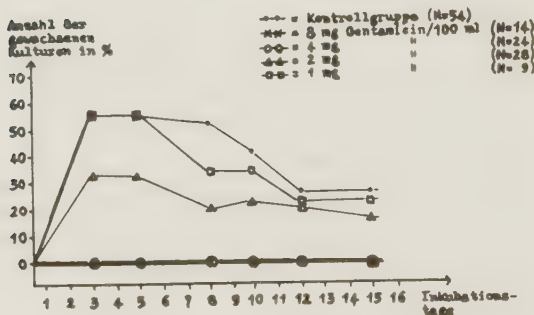
Abb. 6: Proliferierende Linsenepithelzellen nach 2 Tagen Inkubation unter Zusatz von 1 mg Gentamicin/100 ml (1:80)

c. Serienergebnisse aus allen Versuchsansätzen mit Gentamicin

Tab.2: Fibroblastenähnliches Wachstum bei Gentamicinzusatz:
Einzelergebnisse der Klulturen aus der Versuchsreihe I

Ansatz	Zeitpunkt	3. Tag	5. Tag	8. Tag	10. Tag
	Konz. Wachstum in mg/100ml	nein ja gesamt	nein ja gesamt	nein ja gesamt	nein ja gesamt
1	8	14 0 14	14 0 14	14 0 14	14 0 14
	als %	(100) (0) 100	(100) (0) 100	(100) (0) 100	(100) (0) 100
2	4	24 0 24	24 0 24	24 0 24	24 0 24
	als %	100 0 100	100 0 100	100 0 100	100 0 100
3	2	19 9 28	19 9 28	23 5 28	21 7 28
	als %	58 32 100	68 32 100	85 15 100	75 25 100
4	1	4 5 9	4 5 9	6 3 9	6 3 9
	als %	(45) (55) 100	(45) (55) 100	(67) (33) 100	(67) (33) 100
Kontrolle Gesamt		24 30 54	18 22 40	17 18 35	20 14 34
	als %	45 55 100	45 55 100	48 52 100	59 41 100

Graph.1: Graphische Darstellung der Anzahl der gewachsenen Kulturen in % aus allen Versuchsserien mit Gentamicin in Abhängigkeit von den Inkubationstagen



Die Ergebnisse der Kontrollgruppe wurden mit denen der Verdünnungsreihen, bei denen noch Wachstum zu verzeichnen war, mittels einer einfachen Varianzanalyse verglichen. Als Maß für den Behandlungseffekt diente der Anteil der Tage mit Wachstum an der Gesamtzahl der Beobachtungstage.

Die Gesamt-F-Testgröße betrug 1,64. Der kritische Wert der zugehörigen F-Verteilung mit (2,69) Freiheitsgraden und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% liegt über 3,07. Es läßt sich also kein Unterschied im Wachstum zwischen der Kontrollgruppe und den Konzentrationen 2 und 1 mg Gentamicin/100ml sichern.

Aus der Tabelle 2 und der Graphik 1 läßt sich erkennen, daß der Zusatz von Gentamicin zu TCM-199 mit 20% Kälberserum in einer Konzentration von 4 mg/ 100 ml und darüber eine vollständige Hemmung des Epithelwachstums über den gesamten Beobachtungszeitraum bewirkt, das entspricht einem Wachstum von 0%. Die Inkubation der Kulturen unter Zusatz von 2 mg Gentamicin/100 ml erbrachte eine Proliferationsrate von 32% am dritten und fünften Tag. Bei einer Konzentration von 1 mg Gentamicin/100 ml zeigte sich am dritten und fünften Tag eine Wachstumsrate von 55%. Statistisch ließ sich für die Konzentrationen von 2 und 1 mg/100 ml kein Unterschied zur Kontrolle sichern. Die Abnahme der Proliferationstendenz nach sieben Tagen Inkubation ist nicht sicher zu beurteilen, da auch bei der Kontrollgruppe eine Verringerung der Wachstumsneigung, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß zu verzeichnen war.

3. Kulturen unter Zusatz von Penicillin G

a. Biomikroskopische Befunde

Die Übersichtsaufnahme bei der Ausgangskonzentration von 800 000 I.E. Penicillin G/100 ml ließ neben überlebenden vermehrt geschädigte und tote Zellen erkennen. Bei höherer Vergrößerung zeigten sich Epitheldegenerationen in Form von Zellauftreibung und intrazellulären Vakuolen. Man konnte keine Anzeichen von Epithelaussprossung erkennen (siehe Abb. 7). Im Lauf der weiteren Beobachtung blieb das Wachstum gehemmt, die Alteration nahm zu und immer mehr Zellen gingen vakuolig zugrunde. Nach Verdünnung der zu untersuchenden Substanz auf 400 000 I.E./100 ml bot sich ein unregelmäßiges Bild. Bei wenigen Kulturen setzte nach zwei Tagen Inkubation vereinzelt fibroblastenähnliche Proliferation ein. Stets fand man überlebende Zellen, vermehrt vakuolige Einschlüsse und abgestorbene Epithelien. Ab dem achten Inkubationstag traten keine proliferierenden Zellen mehr auf. Bei einer Verdünnung der Penicillinkonzentration auf 200 000 I.E./100 ml bot sich morphologisch ein der Kontrollgruppe entsprechendes Bild. Eine hinreichende Übereinstimmung der Anzahl der gewachsenen Kulturen mit der Kontrollgruppe ließ sich bei 100 000 I.E. Penicillin g/100 ml erzielen.

b. Biomikroskopische Aufnahme einer Linsenepithelkultur in TCM-199 mit 20% Kälberserum unter Zusatz von Penicillin G



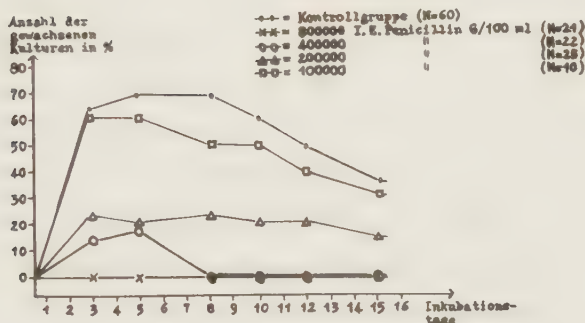
Abb. 7: Überlebende und vakuolig degenerierte, vergrößerte Linsenepithelzellen unter Zusatz von 800 000 I.E. Penicillin G/100 ml nach 2 Tagen Inkubation (1:80)

c. Serienergebnisse aus allen Versuchsreihen mit Penicillin G

Tab.3: Fibroblastenähnliches Wachstum unter Zusatz von Penicillin G:
Ergebnisse aus der Versuchsreihe II

Zeitpunkt		3. Tag		5. Tag		8. Tag		10. Tag	
Ansatz	Konz. Wachstum in mg/100ml	nein ja gesamt		nein ja gesamt		nein ja gesamt		nein ja gesamt	
		21	0 21	21	0 21	21	0 21	21	0 21
1	800 000	100	0 100	100	0 100	100	0 100	100	0 100
	als %								
2	400 000	19	3 22	18	4 22	22	0 22	22	0 22
	als %	87	13 100	82	18 100	100	0 100	100	0 100
3	200 000	19	6 25	20	5 25	19	6 25	20	5 25
	als %	76	24 100	80	20 100	76	24 100	80	20 100
4	100 000	4	6 10	4	6 10	5	5 10	6	4 10
	als %	(40)	(60) 100	(40)	(60) 100	(50)	(50) 100	(60)	(40) 100
Kontrolle Gesamt:		22	38 60	16	35 51	14	32 46	17	25 42
	als %	37	63 100	31	69 100	31	69 100	41	59 100

Graph. 2: Graphische Darstellung der Anzahl der gewachsenen Kulturen in % aus allen Versuchsserien mit Penicillin G in Abhängigkeit von den Inkubationstagen.



Die Gesamt-F-Testgröße der Varianzanalyse für den Vergleich der Anteile von Tagen mit Wachstum betrug 12, 18. Die Voraussetzung gleicher Varianzen in den Gruppen war allerdings nicht gut erfüllt. Der berechnete Wert liegt über dem zugehörigen Wert von etwa 4,13 der F-Verteilung mit (3,99) Freiheitsgraden, so daß sich ein statistisch gesicherter Unterschied ergibt. Bei den anschließenden Paarvergleichen nach SCHEFFE' ergaben sich auf dem 1%-Niveau gesicherte Unterschiede zwischen Kontrolle und den Konzentrationen von 400 000 und 200 000 mg Penicillin G/100ml, jedoch nicht zwischen Kontrolle und der Konzentration von 100 000 mg Penicillin G/100ml (F-Wert 0,40).

Die Tabelle 3 und Graphik 2 zeigen, daß der Zusatz von 800 000 I.E. Penicillin G/100 ml zu TCM-199 mit 20% Kälberserum zu einer vollständigen Hemmung des Epithelwachstums während der gesamten Beobachtungsdauer führte. Das entspricht einem Wachstum von 0%. Die Inkubation der Kulturen mit 400 000 I.E. Penicillin G/100 ml erbrachte am 3. Tag 13% und am 5. Tag 18% gewachsene Kulturen. Nach dem 7. Tag war regelmäßig kein Wachstum mehr nachweisbar, das entspricht einer Rate von 0%. Bei Zusatz von 400 000 I.E. Penicillin G lag die Proliferationsrate am 3. Tag mit 24% noch deutlich unter dem Normwert der Kontrollgruppe. Ein dem Normalwert vergleichbares Ergebnis mit einer Wachstumsrate von 50% ließ sich bei einem Zusatz von 100 000 I.E. Penicillin G/100 ml erzielen.

4. Kulturen unter Zusatz von Rolitetetracyclin

a. Auswertung der biomikroskopischen Beobachtungen

Die Übersichtsvergrößerung zeigte bei einer Konzentration von 16,5 mg Rolitetetracyclin/100 ml am 3. Inkubationstag überlebende und proliferierende Zellen. Die höheren Vergrößerungen ließen reges fibroblastenähnliches Wachstum erkennen, das im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert erschien, so daß kleine Epithellücken schon nahezu reepithelisiert waren (siehe Abb. 8). Die polymorph gestalteten Zellen fanden sich vergrößert mit zahlreichen Protoplasmafortsätzen. Ab dem 5. Inkubationstag wiesen die gewachsenen Epithelien jedoch dichte, gelb-braune und vakuolige Einlagerungen als Zeichen toxischer Alteration auf, wobei die Zell- und Kernvergrößerung bestehen blieb. Die Zellen verharrten während der weiteren Beobachtung in diesem Zustand und bildeten keine neuen Protoplasmafortsätze mehr aus. Nach Verdoppelung der Konzentration auf 33 mg Rolitetetracyclin/100 ml trat eine völlige Hemmung des Zellwachstums ein. Am 3. Tag fanden sich neben überlebenden Zellen im erhaltenen Verband viele alterierte. Diese waren im Vergleich zur Kontrollgruppe geschrumpft und hatten an Durchsichtigkeit

verloren oder waren bereits abgestorben. Während der folgenden Tage nahmen die Epitheldegenerationen und die Anzahl der zugrunde gegangenen Zellen weiter zu (siehe Abb. 9). Bei einer Konzentration von 11 mg Rolitetetracyclin/100 ml zeigten die Kulturen nach anfänglichem Wachstum am 5. Tag wieder die oben beschriebenen Einschlüsse. Die Epithelien veränderten während der weiteren Beobachtung ihr Aussehen nicht mehr. Die gelb-braunen und vakuoligen Einlagerungen traten auch bei einer Konzentration von 8,2 mg Rolitetetracyclin/100 ml auf (siehe Abb. 10 und 11), wobei sich aber an anderen Stellen des Kapselhäutchens immer wieder fibroblastenähnliche Proliferation erkennen ließ.

Der Nachweis, daß es sich bei den degenerativen Ablagerungen um Lipide handelt, konnte mit der Oil-Red-O Färbung ohne vorherige Fixation erbracht werden. Die Übersichtsvergrößerung zeigte zahlreiche, oft zirkulär angeordnete Fettablagerungen. Bei höherer Vergrößerung konnte man mittel- bis großstropfige, intrazelluläre Lipidvakuolen erkennen (siehe Abb. 12 und 13). Außerdem fiel wieder die Zell- und Kernvergrößerung, teilweise aber auch Karyolyse auf.

Bei einer Konzentration von 4,1 mg Rolitetetracyclin/100 ml fand sich regeres Wachstum der Epithelien als bei der Kontrollgruppe, wenn auch die Zellen immer noch vermehrt Zelleinschlüsse aufwiesen (siehe Abb. 14).

- b. Biomikroskopische Aufnahmen von Linsenepithelkulturen unter Zusatz von Rolitetracyclin zu TCM-199 mit 20% Kälberserum



Abb.8: Proliferierende Linsenepithelzellen unter Zusatz von 16,5 mg Rolitetracyclin/100 ml am 3.Tag, fortgeschrittene Reepithelisierung des Kapselhäutgens (1:80)



Abb.9: Überlebende und tote Linsenepithelzellen unter Zusatz von 33 mg Rolitetracyclin/100 ml, 8.Tag (1:80)



Abb.10: Fibroblastenähnlich wachsende Linsenepithelzellen unter Zusatz von 8,2 mg Rolitetracyclin/100 ml am 3. Tag (1:80)



Abb.11: Gleiche Kultur wie oben am 8. Tag der Inkubation dichte gelb-braune und vakuolige Zelleinschlüsse (1:80)

Oil-Red-O-Färbung eines auf einem Objektträger gezüchteten Zellrasens: Kerne blau, Lipide orange

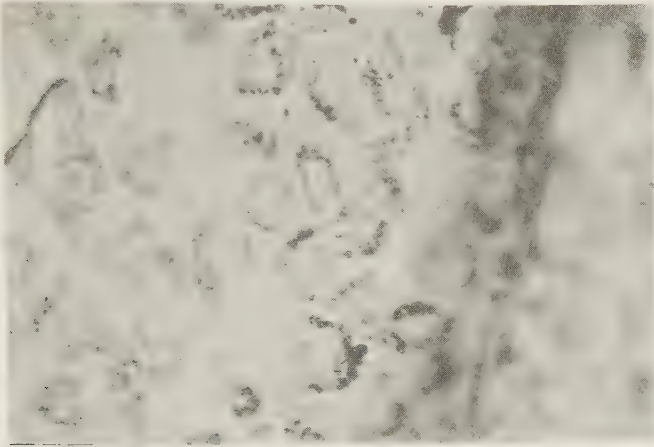


Abb.12: Proliferierte Linsenepithelzellen unter Zusatz von 8,2 mg Rolitetracyclin/100 ml am 8. Tag, vergrößerte Zellen und Kerne, mittel- bis grobstropfige Lipidvakuolen als Zeichen der Degeneration (1:250)

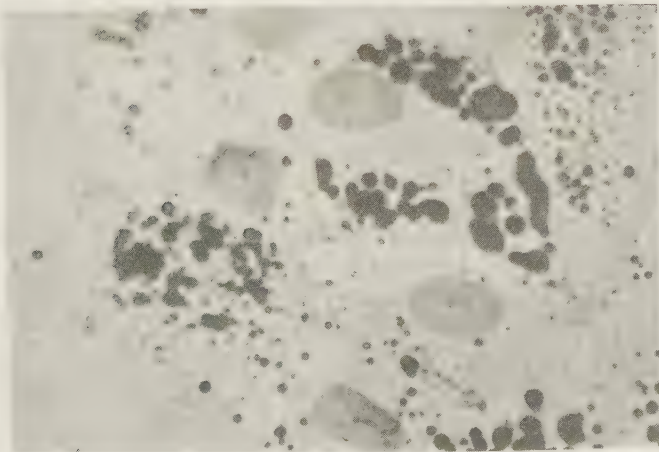


Abb.13: Gleiches Präparat wie oben (1:1000 Olimmersion)

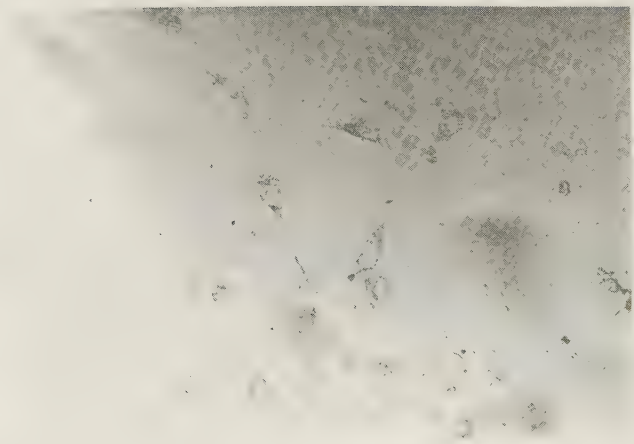


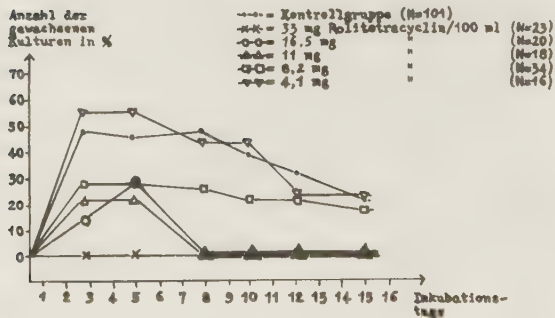
Abb.14: Proliferierende Linsenepithelzellen unter Zusatz von 4,1 mg Rolitetetracyclin/100 ml am 8.Tag, vermehrt intrazelluläre Lipidablagerungen

c. Serienergebnisse aus allen Versuchsreihen mit Rolitetetracyclin

Tab. 4: Fibroblastenähnliches Wachstum unter Zusatz von Rolitetetracyclin:
Einzelsergebnisse aus der Versuchsreihe III

Ansatz	Zeitpunkt Konz. Wachstum in mg/100ml	3. Tag		5. Tag		7. Tag		10. Tag	
		nein	ja gesamt	nein	ja gesamt	nein	ja gesamt	nein	ja gesamt
1	33	23	0	23	0	23	0	23	0
	als %	100	0	100	0	100	0	100	0
2	13,5	17	0	20	0	20	0	20	0
	als %	95	15	100	70	100	0	100	0
3	11	14	4	18	4	18	0	18	0
	als %	(75)	(22)	100	(75) (22)	100	(0)	100	(0)
4	8,2	24	10	34	10	34	9	33	8
	als %	71	29	100	71	29	100	76	24
5	4,1	7	9	16	7	9	16	9	7
	als %	(44)	(56)	100	(44) (56)	100	(56) (44)	(56) (44)	100
Kontrolle Gesamt:		52	49	101	49	42	41	50	32
	als %	52	48	100	54	46	100	61	39

Graph.3: Graphische Darstellung der Anzahl der gewachsenen Kulturen in % aus allen Versuchsserien mit Rolitetetracyclin in Abhängigkeit von den Inkubationstagen



Die Gesamt-F-Testgröße der Varianzanalyse für den Vergleich der Anteile von Tagen mit Wachstum betrug 5,29. Die Voraussetzung gleicher Varianzen in den Gruppen war allerdings nicht gut erfüllt. Der berechnete Wert liegt über dem zugehörigen Wert 3,95 der F-Verteilung mit (4,165) Freiheitsgraden, so daß sich ein statistisch gesicherter Unterschied ergibt. Bei den anschließenden Paarvergleichen nach SCHEFFÉ ergaben sich auf dem 5%-Niveau gesicherte Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Konzentrationen von 13,5 und 11 mg Rolitetetracyclin/100ml, jedoch nicht zwischen Kontrolle und den Konzentrationen 8,2 und 4,2 mg Rolitetetracyclin/100 ml (F-Werte 0,94 und 0,00).

Aus der Tabelle 4 und Graphik 3 läßt sich erkennen, daß der Zusatz von 33 mg Rolitetracyclin/100 ml zu TCM-199 mit 20% Kälberserum zu einer vollständigen Hemmung des Zellwachstums führte, was einem Wachstum von 0% entspricht. Bei einer Konzentration von 16,5 und 11 mg/100 ml zeigte sich am dritten Tag bei 15% bzw. 22% der Kulturen fibroblastenähnliche Proliferation, nach dem fünften Tag jedoch ließ sich keine neue Zellaussprossung mehr erkennen. Bei einer Konzentration von 8,2 mg/100 ml lag die Wachstumsrate am dritten und fünften Tag bei 29%, bei einer Konzentration von 4,1 mg/100 ml jeweils bei 56%. Für die beiden letzten Konzentrationen ließ sich statistisch kein Unterschied zur Kontrollgruppe sichern.

D. DISKUSSION

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Antibiotika besitzen nach Heilmeyer, Otten und Plempel unterschiedliche Wirkungsmechanismen. Gentamicin verfälscht die Proteinsynthese der Bakterien durch Änderung des Aminosäureeinbaus, Penicillin G stört die Biosynthese der Zellwand durch irreversible Bindung der Transpeptidasen und führt damit zur Zellyse und Tetracyclin hemmt die Proteinsynthese. Ungeachtet der Meinung, daß Antibiotika in hoher Dosierung auf menschliche und tierische Zellen nicht toxisch wirken können, da diese andere Enzymmuster als die Bakterien besitzen, sind zahlreiche Nebenwirkungen bekannt geworden. Unsere Ergebnisse belegen, daß die Antibiotika in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz und ihrer Konzentration auch die Linsenepithelzellen empfindlich schädigen können.

Gentamicin bewirkt in einer Konzentration von 8 und 4 mg/100 ml eine vollständige Hemmung der proliferativen Zellaussprossung und führt zu Zellalterationen und zum Absterben der Epithelien. Bei einer Konzentration von 2 und 1 mg/100 ml läßt sich zur Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied sichern, so daß diese Konzentrationen als gut verträglich anzusehen sind.

Penicillin G führt in einer der angegebenen Maximaldosierung entsprechenden Konzentration von 800 000 I.E./100 ml zur völligen Wachstums hemmung und Schädigung der Linsenepithelzellen bis zum vermehrten Zelluntergang. Eine verminderte Proliferationsneigung und Epithelalteration findet man bei Konzentrationen von 400 000 und 200 000 I.E./100 ml. Bei einer Konzentration von 100 000 I.E./100 ml läßt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle sichern, so daß diese Konzentration als gut verträglich anzusehen ist. Rolitetetracyclin bewirkt in einer Konzentration von 33 mg/100 ml eine vollständige Hemmung der fibroblastenähnlichen Zellaussprossung und führt neben degenerativen Veränderungen zum Absterben der Kulturen. Nach anfänglichem Wachstum zeigten sich bei Konzentrationen von 16,5 und 11 mg/100 ml nach fünf Tagen deutliche Zeichen von Epithelalteration in Form von intrazellulären Lipidablagerungen und einer Proliferationshemmung. Vermehrt fettige Degenerationen traten auch bei 8,2 und 4,1 mg Rolitetetracyclin/100 ml auf, wobei sich aber zur Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Wachstumsrate zeigte, so daß diese Konzentrationen als verträglich anzusehen sind.

Aus den mitgeteilten Experimenten geht hervor, daß das Verhalten der Linsenepithelien in Kultur ein empfindlicher Indikator für den schädigenden Einfluß

von Antibiotika ist, da die Zellen auf ihre Einwirkung durch morphologische Veränderungen verschiedenster Form reagieren. Bei der Anwendung der Antibiotika ist daher nicht nur das Wirkungsspektrum gegenüber den zu eliminierenden Keimen, sondern auch die jeweilige Verträglichkeit und notwendige Konzentration von entscheidender Bedeutung.

In der Literatur waren analoge Untersuchungen nicht auffindbar. Die Veröffentlichungen über die Gewebealterationen in vivo hingegen bringen unterschiedliche Ergebnisse. Peyman, May und Ericson berichten, daß eine Applikation von 4 mg Gentamicin/0,2 ml physiologische Kochsalzlösung in die Vorderkammer ohne Schaden vertragen wird. Hanselmayer stellt nach Injektion von Gentamicin in einer Konzentration über 4 mg/ml in die Vorderkammer deutliche Reizerscheinungen in Form von Zellvermehrung, Hornhauttrübung und Iritis fest. Als Lösungsmittel verwendete er Ringerlösung. Nach Honegger wird eine Spülung der Vorderkammer mit 27,5 mg Rolitetracyclin/ml gelöst in physiologischer Kochsalzlösung ohne Alteration vertragen. Kühle und Dimmling dagegen fanden bereits bei einer Konzentration von 5 mg/ml iritische Reizung. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Untersuchungen von Krejci,

Brettschneider und Triška, die nach lokaler Applikation von Tetracyclin mit Hilfe von hydrophilen Kontaktlinsen als Substrat der schädigenden Wirkung des Antibiotikums ab dem 5. Behandlungstag diffuse, gelbliche Trübungen der Augenlinse fanden und zwar sowohl im Bereich des Kerns als auch der Rinde. Nach Meinung von Krejci handelt es sich dabei um den Beginn einer durch Tetracyclin hervorgerufenen Katarakt. Bei unseren Versuchen traten ebenfalls nach fünf Tagen Veränderungen an proliferierenden Linsenepithelien in Form von gelb-braunen Zelleinschlüssen auf, die sich als intrazelluläre Lipidablagerungen identifizieren ließen. Es handelt sich hierbei um die erstmals beschriebene und gedeutete Beobachtung einer solchen Veränderung durch Antibiotika am Linsenepithel in vitro. Peyman und Mitarbeiter berichten ebenfalls von Kataraktentstehung bei Kaninchen nach Injektion von 2 mg Gentamicin/0,1 ml gelöst in physiologischer Kochsalzlösung in den Glaskörper. Innerhalb von 48 Stunden bildeten sich zunächst Vakuolen im Bereich der vorderen und hinteren Linsenkapsel aus und in fünf Wochen entstand eine mature Katarakt. In welcher Weise dabei eine primäre Schädigung der Linsenepithelzellen eine Rolle spielte, ging aus der Schilderung nicht hervor.

In diesem Zusammenhang interessieren auch die Untersuchungen von Mester und Stein über die Wirkung von Gentamicin auf das Corneaendothel, da es sich ebenso wie beim Linsenepithel um eine einzellige Schicht von Zellen handelt. Sie stellten nach Spülung der Vorderkammer mit 0,5% Lösung als Ausdruck der toxischen Wirkung nach 6 Stunden eine deutliche zahlenmäßige Abnahme der vitalen Endothelzellen fest.

Insgesamt kann man feststellen, daß auf Grund der anderen Verhältnisse in vivo ein direkter Vergleich der Literatur mit unseren Ergebnissen nicht möglich ist, zumal da sich auch die Methodik, die Konzentrationsangaben, Applikationsweise, Lösungsmittel und überdies die Beurteilungskriterien der einzelnen Autoren unterscheiden. Bei den eigenen Beobachtungen handelt es sich um ein Inkubationsmodell mit gut definierten Versuchsbedingungen, welches von U. Mayer seit 1968 bereits in vielfacher Hinsicht beobachtet und beschrieben wurde. Insgesamt kann man erkennen, daß in vivo höhere Konzentrationen vertragen werden und zwar aus folgenden Gründen: Zum einen nimmt die Antibiotikumkonzentration durch die Clearance wie z.B. durch den Abfluß mit dem Kammerwasser rasch ab. Dies belegen die Untersuchungen von Saubermann, der nach

Injektion von 100 000 I.E. Penicillin G in die Vorderkammer nach 4,5 Stunden noch 875 I.E./ml und nach Vorderkammerspülung mit 1000 000 I.E./Penicillin G nach 2 Stunden noch 680 I.E./ml nachweisen konnte, so daß die Zellen nur kurze Zeit mit den hoch konzentrierten Antibiotika in Berührung kommen. Zum anderen beträgt nach Heilmeyer, Otten und Plempel die Inaktivierung im Körper in erster Linie durch die Eiweißbindung für Gentamicin 25 - 30%, für Penicillin G und für Rolitetracyclin 30 - 50%. Des weiteren spielt bei der Applikation in die Vorderkammer die Verdünnung durch das zufließende Kammerwasser eine Rolle.

Nicht nur bei der Anwendung der Antibiotika am Patienten, sondern auch bei der Konservierung von Gewebe, das zur Transplantation vorgesehen ist, spielt neben dem Wirkungsspektrum die Verträglichkeit eine bedeutende Rolle, da die Zellen möglichst lange unbeschädigt bewahrt werden sollen. Hornhäute können etwa sechs Tage in einem geeigneten Medium konserviert werden, welchem Antibiotika in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt werden. Schmidt-Martens et al geben 5 000 I.E., van Horn et al 12 500 I.E. und Aquavella et al 10 000 I.E. Penicillin G pro 100 ml Medium an. Bigar und Schimmelpfennig verwenden

100 mg Gentamicin/ml, Draeger 200 mg Gentamicin/ml und Schimmelpfennig und Wittmer und Yokota, Waller und Leydhecker 250 mg Gentamicin/ml Medium. Auf Grund unserer, statistisch gesicherter Ergebnisse an Kulturen aus Linsenepithelien lassen sich folgende Konzentrationen als verträglich empfehlen: Für Gentamicin 2 mg/100 ml, für Penicillin G 100 000 I.E./100 ml und für Rolitetracyclin 8,2 mg/100 ml Medium. Diese Konzentrationen liegen alle über der minimalen Wirkkonzentration, die für Gentamicin bei 0,1 bis 0,2 mg/100 ml, für Penicillin G bei 10 bis 20 I.E./100 ml und für Rolitetracyclin bei 0,05 bis 0,15 mg/100 ml liegen (Heilmeyer, Otten und Plempel).

Bei der Anwendung der Antibiotika spielt also angesichts der geschilderten Untersuchungen auch in gängigen Konzentrationen nicht nur das Spektrum der zu eliminierenden Krankheitserreger, sondern auch die Empfindlichkeit der zu bewahrenden Zelle eine entscheidende Rolle.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Verträglichkeit der Antibiotika Gentamicin, Penicillin G und Rolitetetracyclin wurde an Hand ihres Einflusses auf das Wachstum von Gewebekulturen aus Linsenepithel geprüft. Die Antibiotika ließen sich in handelsüblicher Form einem geeigneten Medium in bestimmter Konzentration zusetzen, als Kontrolle diente das Kulturmedium alleine. Als Kriterien für die Epithelschädigung dienten neben der Hemmung der fibroblastenähnlichen Aussprossung morphologische Zellveränderungen verschiedenster Art. Als statistisch gesichert erwies sich dabei für Gentamicin eine Konzentration von 2 mg/100 ml, für Penicillin G von 100 000 I.E./100 ml und für Rolitetetracyclin von 0,2 mg/100 ml als verträglich. Bei höheren Konzentrationen traten neben einer teilweisen bis vollständigen Proliferationshemmung degenerative Veränderungen in Form von Zell- und Kernvergrößerungen, Zell- und Kernschrumpfungen, Karyolyse, intrazellulären Ablagerungen und Zelluntergang auf.

LITERATURVERZEICHNIS

- Anwärter, W. und P. Naumann: Untersuchungen in vitro zur antibakteriellen Aktivität von Gentamicin
Drug Res. 18: 1115-1119 (1968)
- Aquavella, I. V., Van Horn, D. L. und Haggerty, C. J.:
Corneal Preservation Using M-K Medium
Am. J. Ophthalmol. 80 (5): 791-799 (1975)
- Bakker, A.: Eine Methode, die Linsen erwachsener Kaninchen außerhalb des Körpers am Leben zu erhalten
Arch. Ophthalmol. 135: 581-592 (1936)
- Bigar, F. und Schimmelpfennig, B.: Heutige Möglichkeiten der Hornhautaufbewahrung
Ophthalmologica 172(2-3): 93-100 (1976)
- Brini, A.: L'épithélium antérieur du cristallin humain normal vu par la méthode de l'étalement
Bull. Soc. Ophthalmol. Fr.: 675-678 (1952)
- Draeger, J.: Voraussetzungen zur Verwendung konservierten Spendermaterials für die Keratoplastik
Klin. Mbl. Augenheilk. 171: 210-215 (1977)
- Furgiuele, F. P., Kiesel, R. und Martyn, L.: Pseudomonas infections of the rabbit cornea treated with Gentamicin
Am. J. Ophthalmol. 69: 818 (1965)
- Halasa, A. H.: Ergebnisse bei der Behandlung bedrohlicher bakterieller Augeninfektionen mit Gentamicin
Am. J. Ophthalmol. 63: 1699-1702 (1967)
- Hanselmayer, H.: Über die Verträglichkeit von intraocular appliziertem Gentamicin
Albrecht von Graefe Archiv 180: 277-280 (1971)

- Hanselmayer, H.: Ergebnisse bei der Behandlung bedrohlicher bakterieller Augeninfektionen mit Gentamicin
Klin.Mbl.Augenheilkunde 158:852-855 (1971)
- Heilmeyer, L., Otten, H. und Plempel, M.: Antibiotika-Fibel
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1969
- Honegger, H.: Über die Verträglichkeit von Antibiotika in der Vorderkammer. Ein Beitrag zur Behandlung von intraocularen Infektionen.
Albrecht von Graefe Archiv Ophthal. 165: 343-360 (1963)
- Kirby, D.B.: A study of the nutrition of the chrystalline lens. The cultivation of lens epithelium.
Trans.Amer.Acad.Ophthal.Otolaryng. 31:137 (1926)
- Kirby, D.B., Estey, K. und Tabor, F.: Cultivation of lens epithelium in vitro. A further study.
Archiv Ophthal. Chicago 1: 358-365 (1929)
- Krejci, L., Brettschneider, I. und Triška, J.: Tetracycline Hydrochloride and Lens Changes
Ophthal.Res. 10: 36-40 (1978)
- Küchle, H.J. und Dimmling, TH.: Experimentelle und klinische Untersuchungen über das Tetracyclin-derivat Reverin in der Ophthalmologie.
Ophthalmologica (Basel) 141: 307-313 (1961)
- Mamo, I.G. und Leinfelder, P.J.: Growth of Lens Epithelium in Culture I und II
Archiv.Ophthal. 59: 414-419 und 420-422 (1958)
- Mann, J.: Tissue Culture of Mouse Lens Epithelium
Brit.J.Ophthal. 32: 591-596 (1948)

- Mayer,U.: Untersuchungen an Gewebekulturen aus
Kälberaugen
Habilitationsschrift, Erlangen (1974)
- Mayer, U.: Wirkung des Pilocarpins auf den Stoff-
wechsel von überlebenden Linsenepi-
thelien und Irisgewebe
Klin.Mbl.Augenheilk.,168: 531-537 (1976)
- Mayer,U. und Schrott,R.: Cortison und Linsenepithel bzw.
Irisgewebe.
Albrecht von Graefe Arch. klin.exp.
Ophthal., 198: 101-104 (1976)
- Mayer,U. und Dengler,G.: Vergleichende Untersuchungen
über den Einfluß von Pilocarpin und Acecli-
din auf den Glucoseverbrauch überlebender
Augengewebe.
Albrecht von Graefe Arch. klin. exp.
Ophthal., 205: 113-120 (1978)
- Mayer,U.: The metabolic sensibility of surviving
ocular tissues to different medicaments.
XXIII Concilium Ophthalmologicum,
Kyoto, 1978
- Merriam,F.C. und Kinsey,V.E.: Studies on the Crystalline
Lenses and Observation on Metabolism of
the Lens.
Arch.Ophthal.43: 979-988 (1950)
- Mester,U. und Stein, H.I.: Untersuchungen zur schädigenden
Wirkung von intraocular appliziertem
Gentamicin
Klin.Mbl.Augenheilk.168:221-223 (1976)

- Naumann,P. und Anwärter,W.: Pharmakologische und therapeutische Eigenschaften von Gentamicin
Experimentelle Studien über Wirkstoffspiegel, Ausscheidung, Stabilität und therapeutische Indikation.
Drug.Res. 18: 1119-1123 (1968)
- Obermann,A.E.: Scanning Electron Mikroskopy Of The Lens And Zonular Fibers.
Amer.J.Ophthalmol.72: 604-607 (1971)
- Riley,E.F. und Devi S.K.: Dynamics of Cell Population in the Rat Lens Epithelium
Exp.Eye Res.6: 383-392 (1967)
- Peymann,G.A., May,D.R. Ericson E.S. und Apple,D.:
Intraocular Injektion of Gentamicin
Arch.Ophthalmol. 92:42-47 (1974)
- Rohen,J.W.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen: Das Auge und seine Hilfsorgane
III:4, 395-399 (1964) Springer Verlag
- Saubermann,G.: Untersuchungen über das Eindringen antibiotischer Substanzen in Kammerwasser und Glaskörper des menschlichen Auges
Bibl. Ophthal (Basel) 46: 1-70 (1956)
- Schimmelpfennig,B. und Wittmer,R.: Hornhautkonservierung bei +37 Degrees im kontinuierlichen Gewebekulturmedium.
Ophthalmologica 175: 275-280 (1977)

- Schmidt-Martens, F.W., Hennighausen, U., Wirz, K. und Teping, C.: Veränderungen im Stoffwechsel des Corneaepithels während der mittelfristigen Hornhautkonservierung.
Albrecht von Graefes Arch. 203(2):145-152 (1977)
- van den Heuvel, I.E.A.: Cytologic Aspects of the Crystalline Lens
Fortschr. Ophthalmol. 5 (1956)
- van Horn, D.L., Schultz, R.O. und Debruijn, J.: Endothelial survival in Corneal Tissue Stored in M-K Medium
Am. J. Ophthalmol. 80(4):642-647 (1975)
- von Sallmann, L.: Experimental studies on early lens changes after roentgen irradiation I. Morphological and cytochemical changes.
Archiv Ophthalmol. 45: 149-165 (1951)
- Voaden, M.J.: Effect of Temperature on Cell Division in the cultured Rabbit Lens
Exp. Eye Res. 11: 7-14 (1971)
- Yokota, S., Waller, W.K. und Leydhecker, W.: Histochemical Evaluation of Enzymes in the Rabbit Corneal Endothelium after Short-term Storage.
Albrecht von Graefes Arch. 22(1):59-69 (1976)

LEBENS LAUF

Gabriele Lang, geb. Gamringer

- 28.6.1955 geboren in Bärnzell, zweites von fünf Kindern
Vater: Dr.med.Johann Gamringer, Augenarzt in
3480 Weiden
Mutter: Dr.med.Gabriele Gamringer, Augen-
ärztin in 8480 Weiden
- 1961-1965: vier Klassen Volksschule in Weiden/Opf.
- 1965-1974: Besuch des Elly-Heuss-Gymnasiums in Weiden
- 22.6.1974: Erlangung des Reifezeugnisses in Weiden
- WS 1974/75: Beginn des Studiums der Medizin an der Fried-
rich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
- SS 1976: Physikum in Erlangen
- SS 1977: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in
Erlangen
- 12.8.1978: Heirat mit Dr.med.Gerd Lang, Arzt aus Weiden
- SS 1979: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in
Erlangen
- 18.11.1980: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in
Erlangen
- 24.11.1980: Erhalt der Approbation als Arzt
- 1.12.1980: Antritt einer Assistentenstelle an der Augen-
klinik der Universität Erlangen

